



TITLE:

タンパク質の構造変化ダイナミクス: 基質との相互作用による特異的運動の実現(複雑な多谷ポテンシャルエネルギー面上で生起する動力学諸問題-タンパク質とその周辺-,研究会報告)

AUTHOR(S):

淵上, 壮太郎

CITATION:

淵上, 壮太郎. タンパク質の構造変化ダイナミクス: 基質との相互作用による特異的運動の実現(複雑な多谷ポテンシャルエネルギー面上で生起する動力学諸問題-タンパク質とその周辺-,研究会報告). 物性研究 2006, 86(1): 99-104

ISSUE DATE:

2006-04-20

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/110428>

RIGHT:

タンパク質の構造変化ダイナミクス： 基質との相互作用による特異的運動の実現

横浜市立大学大学院・国際総合科学研究科 淵上壮太郎

e-mail: sotaro@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

1. はじめに

タンパク質は 20 種類のアミノ酸がつながってできた鎖状分子であり、その配列によって一意的に決められた立体構造へと自発的に折り畳む[1,2]。タンパク質はそれぞれの配列に特異的な立体構造に基づき、それ単独で、もしくは他のタンパク質分子と複合体を形成して、生命活動の維持に必要な多種多様な機能を実現している。このようなタンパク質の機能の中の重要なもののひとつとして、基質との特異的結合による分子認識が挙げられる。この分子認識の機構として、基質の立体構造とタンパク質表面の形状が相補的であることに基づく「鍵と鍵穴モデル」が広く受け入れられている。しかし、タンパク質が固有にもつ「やわらかさ」のため、基質結合に伴いタンパク質の立体構造が大きく変化すること多い[3,4,5]。タンパク質複合体においても同様に、タンパク質の構造変化が重要な役割を果たしている[6]。

このような分子認識の機構を明らかにするには、基質の結合に伴うタンパク質の構造変化がどのようにして実現されるか、を理解することが必要である。タンパク質の構造変化の向きは、基質が結合していない状態のタンパク質の揺らぎの情報から基準振動解析や主成分解析によって抜き出される低振動モードによって、大まかに記述できることが知られている[7,8]。また、タンパク質の構造変化の始まりは、基質結合という摂動に対するタンパク質の揺らぎの応答として理解できるということが線形応答理論に基づいて示されている[9]。しかし、基質との複合体形成に至る経路の詳細やその運動の特徴、および、構造変化を引き起こす動力学的要因はまだよくわかっていない。これらの点を明らかにするには、タンパク質構造変化の時間スケールに迫る長時間分子動力学(MD)シミュレーションを行い、そのダイナミクスを綿密に解析しなければならない。

本研究では、タンパク質の構造変化という特異的運動が実現するメカニズムを明らかにすることを目的として、タンパク質の構造変化を計算機上で再現することを目指すとともに、基質の有無やタンパク質の初期構造の違いなどによってタンパク質ダイナミクスがどのように変化するかを調べた。基質結合に伴い大規模な構造変化を起こすタンパク質としてアデニル酸キナーゼ(AK)を取り上げ、水を陽に含んだ全原子 MD シミュレーションを行った。その結果、タンパク質の大規模な構造変化を再現することに成功し、基質の有無によるタンパク質ダイナミクスの違いも見出すことができたので、そのダイナミクスの解析とあわせて報告する。

2. アデニル酸キナーゼの構造変化

アデニル酸キナーゼ(AK)は214残基からなるリン酸基転移酵素であり、ATPとAMPから2つのADPを合成する反応を触媒する。基質が結合するのに伴い、AKはその立体構造を大きく変化させ、効率的な触媒反応を実現している。基質が結合する前後の各立体構造(オープン型、クローズ型)を図1に示す。この図からわかるようにAKは3つのドメイン(ATP被覆ドメイン、AMP結合ドメイン、中核ドメイン)からできており、構造変化の前後で各ドメインの立体構造はほとんど変わらない。つまり、AKの構造変化は、ドメインの境界部分がちょうど蝶番のような働きをして、ドメインの相対的な配置を変化させるという運動(hinge motion)であることがわかる。

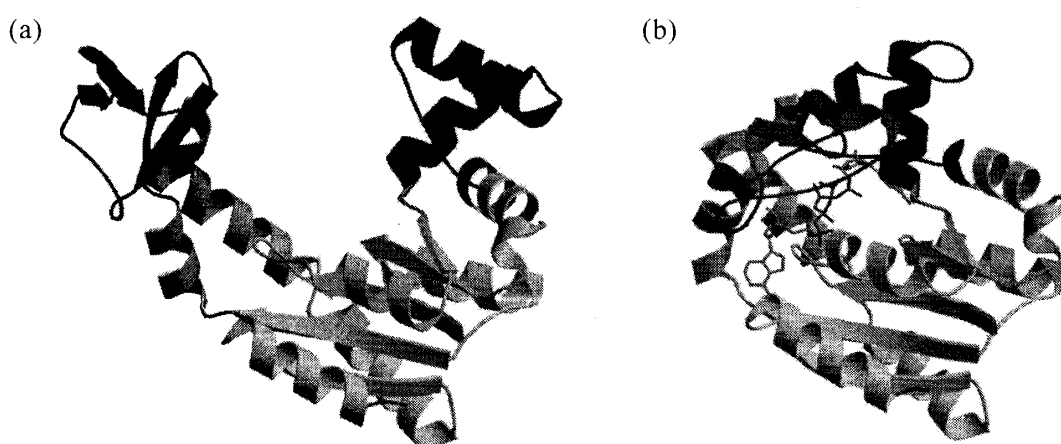


図1：AKの立体構造。(a)は基質が結合していないオープン型構造(PDB code: 4ake)。右上の一团がAMP結合ドメイン、左上の一团がATP被覆ドメイン、残りの中央下部分が中核ドメインである。(b)は基質(阻害剤 Ap_5A 、ワイヤーフレーム図で表示)が結合しているクローズ型構造(PDB code: 1ake)。

3. 分子動力学シミュレーションの詳細

本研究では、AKの初期構造としてオープン型構造(図1a)とクローズ型構造(図1b)の2つを用い、それぞれの構造に対して基質(AMPとATP)が結合している場合とそうでない場合の計4種類の系について、水を陽に含んだ全原子分子動力学シミュレーションを行った。系の総原子数は、オープン型構造とクローズ型構造を用いた場合それぞれにおいて、約7万2千原子、約5万原子であり、大部分を水分子が占めている。クローズ型構造における基質の位置は、阻害剤 Ap_5A の位置を参照にして容易に決定することができる。一方、オープン型構造の場合には基質の配置として様々な可能性が考えられる。そこで本研究では、基質がオープン型構造に対して安定に結合できるようにすることを考え、クローズ型構造における基質結合様式を参考にして、AMPについて

はAMP結合ドメインとの相対位置を保持するように、ATPについては中核ドメインとの相対位置を保持するように基質を配置した。

シミュレーションの実行には、当研究室で開発された分子動力学シミュレーションソフトウェア MARBLE[10]を使用し、力場は CHARMM22[11,12]を用いた。MARBLE では、水素原子を含む原子団を剛体として取り扱うこと(部分剛体分子動力学法)で、SHAKE 法や RATTLE 法によって原子間距離に拘束をかけるよりも高効率な計算を実現している。同時に、その数値積分法としてシンプレクティック数値解法を採用しているため、ミクロカノニカル・アンサンブルにおける計算では系の全エネルギーが高精度で保存される。また、本研究のように大規模な系のシミュレーションを実行するには多数の CPU を用いた並列計算が不可欠であるが、MARBLE では空間分割法および動的負荷分散アルゴリズムの導入により高い並列化効率をも実現している。

本研究のシミュレーションでは、タンパク質周囲の水溶液環境を再現するために周期境界条件を導入した。また、静電相互作用の計算には Particle Mesh Ewald(PME)法[13]を用いた。静電相互作用の計算は全計算時間の大部分を占め、その計算精度がシミュレーション結果の信頼性に直結するのであるが、PME 法では高精度でかつ高速な計算が可能である。シミュレーションの手順としては、まず、タンパク質を大量の水分子中に浮かべた初期構造を作成した後、エネルギー最小化と等温等圧(NPT)アンサンブルによる平衡化によって安定な状態へと落ち着かせる。その後、ミクロカノニカル(NVE)アンサンブルで 10ns の本計算を行った。すべてのシミュレーションにおいて時間刻みは 2 フェムト秒 とした。

4. クローズ型からオープン型への構造緩和

基質がない場合、AK の安定構造はオープン型である。一方、クローズ型の AK は基質がないと不安定であり、より安定なオープン型構造へと緩和していくと考えられる。そこで、オープン型構造の安定性と、クローズ型からオープン型への構造緩和を全原子 MDシミュレーションによって再現し、AK に特有なダイナミクスの詳細を明らかにすることを目指し、基質を含まない AK のみのシミュレーションを行った。

オープン型を初期構造とした場合、AK は大きな構造変化を起こすことなく安定なシミュレーション結果が得られた(図 2 参照)。言うまでもなく、周囲の水からの熱揺らぎによって、AK の構造はオープン型構造の周りに大きく揺らぐ。この揺らぎは X 線結晶解析で求まる温度因子と高い相関を示しており、これより AK の動きがシミュレーションによって適切に再現されたと考えられる。このように AK は水中で大きく揺らいでいるのであるが、その揺らぎは全く無秩序なものではない。AK の 3 つのドメインは比較的良くその立体構造を維持しており、剛体的であることがわかる。つまり、

AK の揺らぎは主にドメイン間の相対的な運動に依っている。このドメイン間の相対的な揺らぎと AK の構造変化の向きには強い相関があり、タンパク質の揺らぎがその構造変化に重要な役割を果たしていることがわかる。

続いて、クローズ型構造を初期構造として 10ns の MD シミュレーションを 5 回行った。この初期条件では、AK の構造はクローズ型からオープン型へと緩和していくことが期待されるが、期待通りの構造緩和が再現されたのは 5 回のうち 2 回であった(図 2 参照)。この 2 本のトラジェクトリにより、AK の立体構造変化の経路についてその全域に渡る全原子レベルの情報を得ることができた。10ns という時間スケールでタンパク質の大規模な構造変化を実現できたことは驚きであるが、タンパク質の構造変化は従来考えられているより速い時間スケールで起こり得るのかもしれない。一方、うまく構造緩和しなかったトラジェクトリにおいては、ドメインが壊れてしまったり、ドメイン間相互作用によってドメイン同士がくっついてしまったりした。このため、オープン型へと正しく構造緩和できなかったと思われる。このような結果が生じた原因は、AK の初期構造がクローズ型で、かつ、基質が存在しないという非現実的な初期条件であったためと考えられる。

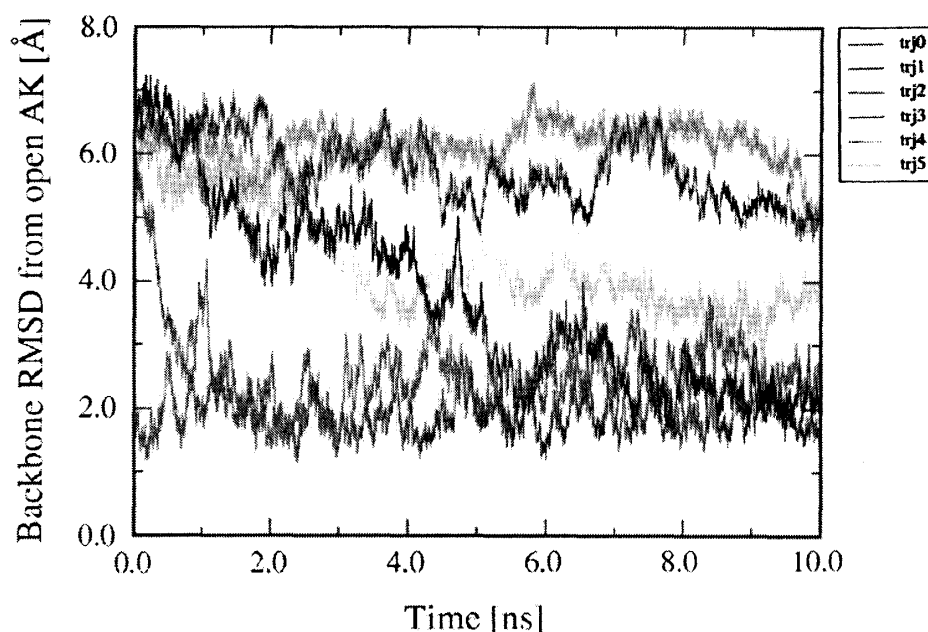


図 2 : 基質なしの MD シミュレーションにおける AK の時間発展。横軸は時間(ナノ秒)。縦軸はオープン型構造との主鎖原子の RMSD(Å)であり、0 Å がオープン型構造、7.1 Å がクローズ型構造である。2 Å 付近から始まっているトラジェクトリはオープン型を初期構造としたもので、一定の揺らぎを示しつつ、構造が安定に維持されていることがわかる。一方、7 Å 付近からはクローズ型を初期構造とした 5 本のトラジェクトリがスタートしているのだが、そのうちの 2 本がオープン型を初期構造としたトラジェクトリと同程度の RMSD にまで到達していることが見て取れる。つまり、この 2 本のトラジェクトリはクローズ型からオープン型への構造緩和を再現している。

構造緩和を再現したトラジェクトリが得られたので、主成分分析を行い、構造変化ダイナミクスを明らかにすることを試みた。第1主成分と第2主成分で張られる空間にトラジェクトリを射影したところ、AKの構造変化には遷移状態が存在することが示唆された(図3参照)。この遷移状態は第2主成分方向の運動がAKの構造変化を妨害するによって生じると考えられる。また、基質なしのオープン型構造のトラジェクトリをこの空間に射影すると、遷移状態近傍にまで到達することができるものの遷移状態を越えることはできないことがわかる。したがって、オープン型からクローズ型への構造変化が実現するためには、基質結合に伴う摂動によってAKのダイナミクスが変化することが本質的に重要であると考えられる。

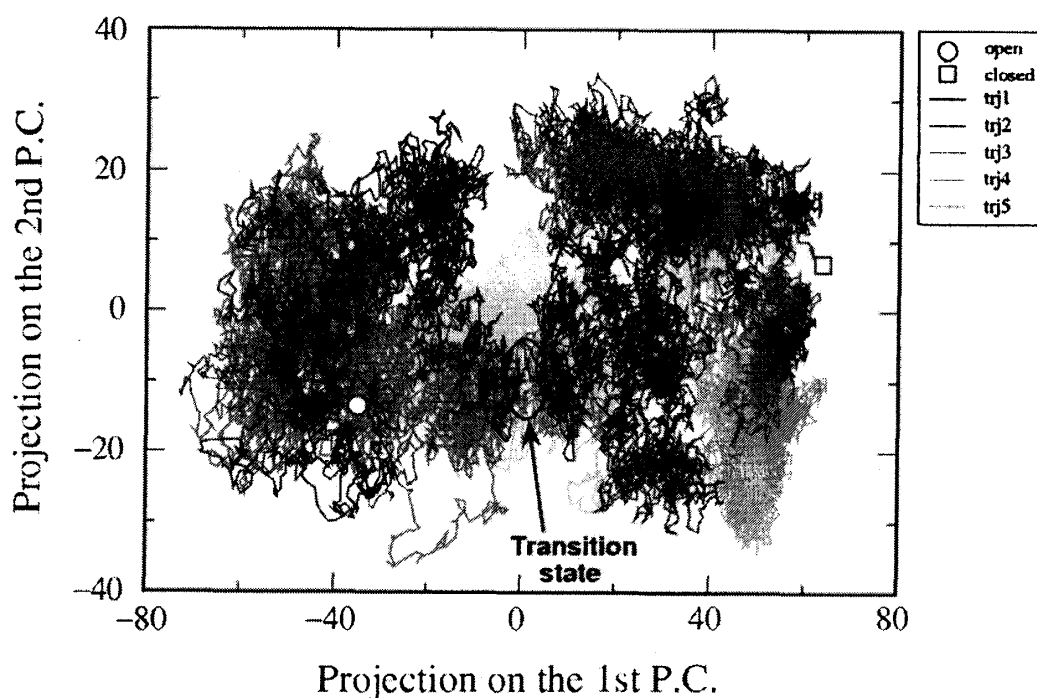


図3：主成分空間におけるAKのダイナミクス。オープン型構造を○で、クローズ型構造を□で示してある。クローズ型を初期構造とし基質を含まないMDシミュレーションの結果5本を描いてある。5本のトラジェクトリのうち、2本がクローズ型からオープン型へと構造緩和していることがわかる。この2本のトラジェクトリはいずれも、その中途において、主成分空間のごく限られた狭い領域を通過しており、ここが遷移状態になっていると考えられる。

5. 基質結合によるAKダイナミクスの変化

そこで、基質を加えた場合のMDシミュレーションも行った。基質がある場合にはAKのクローズ型構造は安定に維持されると思われる。実際、シミュレーションの結果、AKはクローズ型構造の近傍で揺らいでおり、構造変化は見られなかった。ただし、若干であるがAKの構造は開きかかっているようである。これは、結晶中ではパッキングの効果により、水中よりもより閉じた最適な構

造が実現されているからだと考えられる。一方、オープン型構造に基質を結合させた場合、クローズ型構造に向かって構造が閉じていく様子が観察された。また、それに伴い、AK の揺らぎの方向が変化していくこともわかった。しかし、残念ながら今のところクローズ型までの全構造変化は再現されていない。2 つの基質を同時に結合させる現在の方式では構造変化を妨げる第 2 主成分方向の運動を抑制できないようであり、さらなるメカニズムの探求が必要である。

6. おわりに

本研究では、タンパク質の大規模な構造緩和を全原子 MD シミュレーションによって再現することに成功した。それに伴い、構造変化におけるタンパク質ダイナミクスの特徴について議論することが可能となったのだが、その議論はまだ十二分に尽くされていない。今後、構造緩和のトラジェクトリの数を増やし、タンパク質ダイナミクスの本質を浮き彫りにする効果的な解析法を模索するとともに、基質の有無によるダイナミクスの違いについても研究を進めていきたい。

参考文献

- [1] V. Daggett and A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* **28**, 18 (2003).
- [2] J. N. Onuchic and P. G. Wolynes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 70 (2004).
- [3] M. Gerstein, A. M. Lesk and C. Chothia, *Biochemistry* **33**, 6739 (1994).
- [4] A. Gutteridge and J. Thornton, *FEBS Lett.* **567**, 67 (2004).
- [5] A. Gutteridge and J. Thornton, *J. Mol. Biol.* **346**, 21 (2005).
- [6] C.-S. Goh, D. Milburn, and M. Gerstein, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 104 (2004).
- [7] A. Kitao and N. Go, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 164 (1999).
- [8] F. Tama, *Protein Pept. Lett.* **10**, 119 (2003).
- [9] M. Ikeguchi, J. Ueno, M. Sato, and A. Kidera, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 078102 (2005).
- [10] M. Ikeguchi, *J. Comput. Chem.* **25**, 529 (2004).
- [11] B. R. Brooks *et al.*, *J. Comput. Chem.* **4**, 187 (1983).
- [12] A. D. MacKerell Jr. *et al.*, in *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, edited by P. v. R. Schleyer *et al.* (John Wiley & Sons, Chichester, 1998), Vol. 1, p. 271.
- [13] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **103**, 8577 (1995).